

510,328

Rec'd PCT/PTO 05 OCT 2004

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. Oktober 2003 (16.10.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 03/085116 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12N 15/86**,
C07K 14/155

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP03/03500

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. April 2003 (03.04.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 15 123.7 5. April 2002 (05.04.2002) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: CICHUTEK, Klaus [DE/DE]; Theodor-
Heuss-Strasse 54, 63225 Langen (DE). MÜHLEBACH,
Michael [DE/DE]; Waldstrasse 65, 61137 Schöneck (DE).
SCHWEIZER, Matthias [DE/DE]; Luckenbachweg 2,
79115 Freiburg (DE).

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Geibelstrasse 6, 81679
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

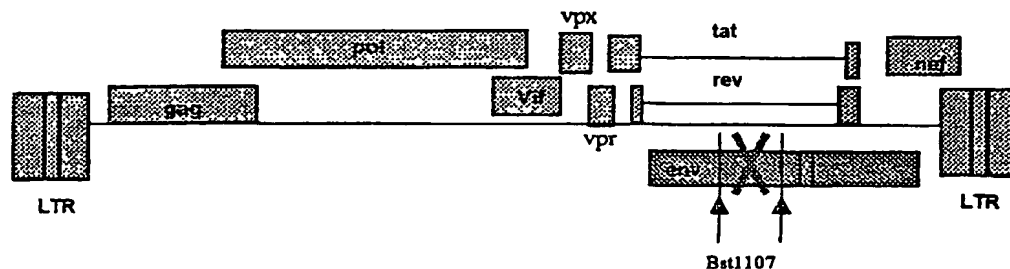
Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: LENTIVIRAL VECTORS DERIVED FROM SIVSMM/PBJ14, METHOD FOR THEIR PRODUCTION AND USES THEREOF

(54) Bezeichnung: VON SIV-SMM/PBJ14 ABGELEITETE LENTIVIRALE VEKTOREN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND ANWENDUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to retroviral vectors (known as lentiviral vectors), which are used to transfer genes into cells that are at cell cycle stage G0, to methods for their production and to the use thereof for transferring genes into mammalian cells. Said vectors are derived from SIVsmmPBj14 (simian immunodeficiency virus) of the sooty mangabey monkey, strain PBj 14.

(57) Zusammenfassung: Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektoren (sogenannte lentivirale Vektoren), mit welchen Gene in Zellen, die sich im Zellzyklusstadium G0 befinden, transferiert werden können, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihrer Verwendung zur Genübertragung in Säugerzellen. Diese Vektoren wurden von SIVsmmPBj14 (Simianes Immunodefizienzvirus der Schopfmangabe („sooty mangabey monkey“), Stamm Pbj 14, abgeleitet.

BEST AVAILABLE COPY

VON SIVSMM/PBJ14 ABGELEITETE LENTIVIRALE VEKTOREN , HERSTELLUNGSVERFAHREN UND ANWENDUNGEN

5

10 Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektoren (sogenannte lentivirale Vektoren), mit welchen Gene in Zellen, die sich im Zellzyklusstadium G0 befinden, transferiert werden können, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung zur Genübertragung in Säugerzellen. Diese Vektoren wurden von SIVsmmPBj14 (Simianes Immunodefizienzvirus der Schopfmangabe („sooty mangabey monkey“), Stamm Pbj14, abgeleitet.

15

Der Ausdruck "lentivirale Vektoren" oder "SIVsmmPBj-Vektoren" bezeichnet infektiöse, aber vermehrungsunfähige Retroviren, die Gene in Form von retroviralen Expressionsvektoren (auch Expressionskonstrukte oder verpackbare Konstrukte genannt) in Zellen einschleusen können. Als Lentiviren wird eine Gruppe der *Retroviridae* bezeichnet, die nach Infektion des Menschen, anderer Primaten und Säuger (z.B. Schafe, Katzen) nach langer Inkubationszeit zur Krankheit führt. Eine allgemeine Übersicht über retrovirale bzw. lentivirale Vektoren findet sich beispielsweise in Miller AD (1997) „*Development and application of retroviral vectors*“. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, Vigna E. Naldini L (2000), *J.Gen. Med.* 2:308 und Palu G. et al. (2000) *Rev. Med. Virol.* 20:185. Der Gentransfer mit retroviralen bzw. lentiviralen Vektoren wird auch als Transduktion bezeichnet. Die Genübertragung führt zur Integration des Expressionsvektors in das Genom der Zelle. Expressionsvektoren beinhalten ein Verpackungssignal *psi*, welches zur Inkorporation der RNA des Expressionsvektors in die Vektorpartikel und zur Genübertragung führt. Als "psi" wird also das Verpackungssignal der Retroviren bezeichnet, das die effiziente Verpackung der Boten-RNA des Expressionsvektors steuert. Der Expressionsvektor muß zudem von lentiviralen LTR-Sequenzen („Long Terminal Repeats“) flankiert sein, damit die korrekte Umschreibung der RNA des Expressionsvektors in DNA und die nachfolgende Integration des Expressionvektorgens in die chromosomale DNA der Zelle erfolgt. Der retrovirale Gentransfer ist vorteilhaft, weil (i) in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in Zellen überführt wird, (ii) das Gen im allgemeinen ohne Mutationen oder Umlagerungen

20
25
30
35

transferiert wird, und (iii) ein stabiler chromosomaler Einbau erfolgt.

Der Tropismus der lentiviralen Vektoren, d. h. die Auswahl der Säugerzellen, in welche diese das Expressionskonstrukt überführen können, wird durch das *env*-Gen in der benutzten Verpackungszelle und damit durch die *env*-Genprodukte in den Vektorpartikeln bestimmt. Das *env*-Gen verschiedener Retroviren, z.B. des murinen Leukämievirus (MLV), verschiedener Lentiviren wie HIV („Humanes Immundefizienzvirus“), SIV („Simianes Immundefizienzvirus“) oder FIV („Felines Immundefizienzvirus“), aber auch von EIAV („Equine Infectious Anemia Virus“) oder CIAV („Caprine Infectious Anemia Virus“), das zur Bildung lentiviraler Vektorpartikel eingesetzt wird, wird in Hüllproteine, das Transmembranprotein (TM) und das Oberflächenhüllprotein (SU), übersetzt, welche die äußere Hülle des lentiviralen Vektors bilden. Die SU-Proteine interagieren und binden an ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die *env*-Genprodukte des amphotropen MLV, des GaLV („Gibbon Ape Leukemia Virus“) und das G-Protein des VSV („Vesicular Stomatitis Virus“; Burns et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8033) werden bisher vor allem benutzt. Amphotrope MLVs replizieren sowohl in murinen als auch in nicht-murinen Zellen. Sie erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen, auch in humane Zellen. Speziell für den selektiven Gentransfer in humane Zellen eines bestimmten Zelltyps, z.B. T-Zellen oder hämatopoetische Stammzellen, sind die *env*-Genprodukte des ecotropen, des amphotropen MLV oder des Milznekrosevirus (SNV; „Spleen Necrosis Virus“) geeignet, wenn sie durch Einbau von Domänen einzelkettiger Antikörper (scFv; „single chain Fv“) oder anderer Liganden für Zelloberflächenproteine wie z.B. der Zytokine oder Wachstumsfaktoren modifiziert wurden.

Während von C-Typ-Retroviren (Viren, deren Core-Partikel eine spärlich-ikosaedrische Form aufweist) abgeleitete Vektoren Fremdgene nur in mitotisch aktive Zellen übertragen können, sind lentivirale Vektoren in der Lage, sowohl aktiv proliferierende als nicht proliferierende Zellen zu transduzieren. Dies hat den Vorteil, daß Leberzellen, verschiedene Hirnzelltypen, T-Zellen und andere, *in vivo* nicht unbedingt proliferationsaktive Zellen auch ohne mitotische Stimulierung transduziert werden können. Allerdings sind alle bisher bekannten, von Lentiviren abgeleiteten Vektoren nur für solche nicht proliferierenden Zellen geeignet, die sich in einem bestimmten Aktivierungszustand, nämlich in der G1-Phase des Zellzyklus, befinden. Die G1-Phase (G; „gap“, Lücke) bezeichnet den Abschnitt innerhalb eines Zellzyklus, welcher der DNA-Synthesephase (S-Phase) vorausgeht. In der G1-Phase wird die.

Zelle auf den Vervielfältigungsprozess durch Herstellung bestimmter Proteine und Enzyme (z.B. Zykline) vorbereitet. Zellen, die sich in der Ruhephase befinden, d.h. sich nicht teilen, befinden sich in der G0-Phase. Sie nehmen nicht mehr am Wachstum des Gewebes oder am Ersatz abgestorbener Zellen teil. Zellen in der G0-Phase wie z.B. viele Stammzellen sind zwar potentielle Zielzellen in vielen Gentherapiestrategien, können bisher jedoch nicht mit retroviralen oder lentiviralen Vektoren transduziert werden.

Im Gegensatz zu allen anderen Lentiviren ist SIVsmmPBj14, ein Immundefizienzvirus der Schopfmangabe (Fultz PN, et al. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 5:397) in der Lage, auch in nicht-stimulierten primären humanen Lymphozyten, die sich in der G0-Phase befinden, zu replizieren. Diese Eigenschaft korreliert mit einer hohen Pathogenität: SIVsmmPBj14 verursacht nach Inter-Spezies-Übertragung in Schweinsaffen eine heftige akute Erkrankung, die oft nach 7-10 Tagen zum Tode führt. Obwohl verschiedene Abweichungen der SIVsmmPBj14-Sequenz gegenüber der des nicht-pathogenen Elternstamms SIVsmm9 gefunden wurden (u.a. in der LTR; „long terminal repeats“, lange terminale Wiederholungen, dem *env*- und dem *nef*-Gen), konnten die viralen Faktoren, die diese besonderen Eigenschaften bestimmen, noch nicht eindeutig identifiziert werden.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, retrovirale Vektoren, die Zellen in der G0-Phase transduzieren können und Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen. Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch den Gegenstand der Patentansprüche gelöst.

Erfindungsgemäß wurde gezeigt, dass die Eigenschaft von SIVsmmPBj14, ruhende Lymphozyten in der G0-Phase infizieren zu können, auf nicht-replikationsfähige, von SIVsmmPBj14 abgeleitete Vektoren übertragen werden kann. Ferner wurde gezeigt, dass diese Eigenschaft nicht vom *env*-Gen von SIVsmmPBj14 abhängig ist und dieses daher nicht im Vektorsystem vorhanden sein muss. Das eröffnet die Möglichkeit, Gene in Zellen zu übertragen, die sich in der G0-Phase des Zellzyklus befinden. Eine solche Übertragung von Genen in Zellen nennt man auch Transduktion.

Die Erfindung betrifft einen retroviralen Vektor, der zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase fähig ist, wobei der Vektor von SIVsmmPBj14 abgeleitet ist. Vorzugsweise ist der retrovirale Vektor auch zur Transduktion von Zellen in der mitotischen und/oder in der G1-Phase fähig. Der erfindungsgemäße retrovirale Vektor weist vorzugsweise eine Deletion eines

Teils oder des gesamten *env*-Gens von SIVsmmPBj14 auf, wodurch in einer besonders bevorzugten Ausführungsform das *env*-Oberflächenhüllprotein nicht mehr funktionsfähig ist.

Unter „Deletion“ versteht man einen Verlust von genetischem Material. Deletion eines Teils des *env*-Gens bezeichnet den Verlust eines beliebigen Teils des *env*-Gens, wobei der Verlust

an beliebigen Stellen des Gens sein kann, z.B. an den Gen-Enden oder innerhalb des Gens und verschieden große Fragmente umfassen kann. Eine bevorzugte Deletion liegt in einer Ausführungsform im SU-Bereich des *env*-Gens vor. Der SU-Bereich kennzeichnet den Abschnitt des *env*-Gens, der für das Oberflächenhüllprotein (SU-Protein) kodiert. In einer

besonders bevorzugten Ausführungsform liegt der erfindungsgemäße Vektor als

Pseudotypvektor vor und umfasst vorzugsweise einen Teil oder das gesamte Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus, insbesondere eines Retrovirus. In bestimmten Ausführungsformen ist das zu SIVsmmPBj14 unterschiedliche Virus aus HIV-1 („Humanes

Immundefizienzvirus-1“), SIVagm („Simianes Immundefizienzvirus“), SNV („Milznekrosevirus“), MLV („Murines Leukämievirus“) oder VSV („Vesikuläres Stomatitis

Virus“) ausgewählt und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus das G-Protein von VSV.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Pseudotypvektoren, umfassend die Schritte: a) Deletieren eines Teils oder des gesamten *env*-Gens von

SIVsmmPBj14 oder eines davon abgeleiteten Moleklarklons wie SIVsmmPBj1.9 und b) Kotransfektion von Zellen mit dem in a) enthaltenen Konstrukt und einem Expressionskonstrukt für ein Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus.

Vorzugsweise liegt die Deletion im SU-Bereich des *env*-Gens vor und das *env*-Oberflächenhüllprotein ist durch die Deletion nicht mehr funktionsfähig. In einer

Ausführungsform sind die kotransfizierten Zellen 293T-Zellen, also menschliche Fibroblasten. In bestimmten Ausführungsformen ist das zu SIVsmmPBj14 unterschiedliche

Virus aus einem Retrovirus ausgewählt. In bestimmten Ausführungsformen ist das zu SIVsmmPBj14 unterschiedliche Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt und in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Hüllprotein eines zu

SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus das G-Protein von VSV.

Des weiteren betrifft die Erfindung nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältliche Pseudotypvektoren.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung eines erfindungsgemäßen Vektors zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase, insbesondere zur Gentherapie. Die Zellen können aktiviert oder nicht aktiviert sein. Die zu transduzierenden Zellen sind vorzugsweise Säugerzellen, insbesondere humane Zellen. In einer Ausführungsform sind die zu transduzierenden Zellen humane Lymphozyten.

Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet ein replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z. B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens übertragen kann. Der hier verwendete Begriff „therapeutisches Gen“ bedeutet eine Nukleinsäuresequenz, die in die Zielzelle mittels des retroviralen Vektors eingeführt werden soll und umfasst komplette Gene, deren Fragmente, Antisense-Nukleinsäuren und dergleichen.

Der hier verwendete Begriff pseudotypisiert bzw. Pseudotypvektor bedeutet, dass der retrovirale Vektor einen Viruskern eines Retrovirus besitzt und die Virushülle von einem anderen Retrovirus stammt.

Der hier verwendete Begriff „SIV“ bezeichnet Viren, die von den Viren der Familie des Simianen Immundefizienzvirus abgeleitet sind. Dazu gehören laut *FIELDS, Virology*, *Cercopithecus aethiops* (SIVagm), neuerdings unbenannt in *Chlorocebus*, *Macaca mulatta* (SIVmac), *Pan troglodytes* (SIVcpz), *Cercopithecus mitis* (SIVsyk), *Papio sphinx* (SIVmnd), *Cercocebus atys* (SIVsm) oder *Maccaca nemestrina* (SIVmne).

SIVsmmPBj14 bezeichnet ein akut letales Virus, das von dem nicht-pathogenen Stamm SIVsmm9 nach Infektion von PBj Makakken abgeleitet ist.

Abbildungen:

Abb.1 zeigt Konstrukte zur Herstellung von [SIVsmmPBj(VSV-G)] Pseudotypvektoren.

A) Genomstruktur von SIVsmmPBj-wt

Die BstZ171-Schnittstellen (bzw. des Isoschizomers Bst11071) zur Einführung der nef-Deletion in pPBj Δ env sind eingezeichnet.

B) Restriktionskarte von pPBj Δ env.

C) Das VSV-G-Expressionskonstrukt pMD.G.

Abb. 2 zeigt einen Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Zellen. Verhältnis der Transduktionstiter der Vektoren auf den arretierten Zellen zu den Transduktionstitern auf proliferierenden Zellen auf Basis der in Tab. 1 angegebenen Daten. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen und deren Standardabweichungen (Fehlerbalken)

Beispiele

Beispiel 1: Konstruktion eines von SIVsmmPBj14 abgeleiteten lentiviralen Pseudotypvektors der ersten Generation

Das *env*-Gen des von SIVsmmPBj14 gewonnenen infektiösen Moleklarklons SIVsmmPBj1.9 (Dewhurst S. et al. (1990), *Nature* 345:636) wurde durch eine Deletion inaktiviert. SIVsmmPBj1.9 wurde mit BstZ17I verdaut, das an den Positionen 6461 und 7577 schneidet, die beide im SU-Bereich von *env* liegen. Nach Entfernung des 1116 bp-Fragments und Religation wurde das Konstrukt pPBj Δ *env* erhalten (Abb. 1), das für das komplette SIVsmmPBj1.9 kodiert, wobei das *env*-SU durch Deletion von 1116 Basen nicht mehr funktionsfähig ist. Durch diese Deletion werden weder andere Gene (*tat*, *nef* etc.), noch bekannte Spleiß-Stellen oder das Rev Responsive Element (RRE) betroffen.

Danach wurden durch Kotransfektion von 293T-Zellen mit pPBj Δ *env* und einem Hüllprotein-Expressionskonstrukt Pseudotypvektoren hergestellt. Als Hüllproteine wurden verschiedene retrovirale Hüllproteine (von SIVsmmPBj1.9 selbst, von HIV-1, SIVagm, SNV, amphotropem und ecotropem MLV) sowie das G-Protein des VSV (Vesicular stomatitis virus, einem Rhabdovirus (*Expressionsplasmid für VSV-G*, Ory DS et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:11400) verwendet. Mit allen Hüllproteinen konnten Pseudotypvektoren hergestellt werden, die mitotische Zellen mit unterschiedlicher Effizienz transduzieren konnten. Da durch diese Vektoren der ersten Generation noch keine Fremdgene, sondern das PBj Δ *env*-Genom übertragen wird, wurde zur Bestimmung der Transfektionseffizienz die Expression von PBj Δ *env*-Genen in den Zielzellen nachgewiesen. Hierzu wurden die transduzierten Kulturen mit einem HIV-2-Serum, das mit verschiedenen SIVsmm-Proteinen kreuzreagiert, im „*in situ* Immunperoxidase Assay“ (IPA) angefärbt. Positive Reaktionen bewiesen die Expression von übertragenen PBj Δ *env*-Genen. Am effizientesten erwiesen sich die mit VSV-G pseudotypisierten Vektoren [SIVsmmPBj(VSV-G)], die im folgenden

hauptsächlich verwendet wurden. Damit wurden Titer um $1-3 \times 10^5$ i.u./ml (infektiöse Einheiten je ml) erreicht (gemessen auf sich teilenden Zielzellen), die durch Ultrazentrifugation noch wesentlich gesteigert werden können.

5 Beispiel 2

Fähigkeit von [SIVsmmPBj(VSV-G)] Pseudotypvektoren der ersten Generation zur Transduktion von G0-arretierten Zellen

Zur Überprüfung der Fähigkeit zur Transduktion von Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus wurde eine humane Zelllinie mit Standardmethoden in der gewünschten Phase arretiert. Untersucht wurden: i) nicht arretierte (sich teilende) Zellen, ii) mit Aphidicolin in G1 arretierte Zellen, iii) mit einer Kombination aus Serumentzug und Äthanol in G0 arretierte Zellen. Die korrekte Arretierung wurde durch Messung des DNA-Gehalts durch Propidiumjodid-Färbung und FACS-Analyse, sowie indirekt durch die Transduktionseffizienz von C-Typ-retroviralen und herkömmlichen lentiviralen Vektoren nachgewiesen. Als Zelllinie wurde die „GHOST CXCR4“ Linie (Owen SM et al., *J. Virol* 72:5425), eine humane Osteosarkom-Linie, verwendet, die stabil mit den CD4- und CXCR4- Rezeptoren sowie einem TAT-abhängigen GFP-Expressionsvektor transfiziert ist. Sie wurde gewählt, da sie gut zu arretieren ist und die Genübertragung durch die GFP-Induktion durch das übertragene SIVsmmPBj-Tat-Gen nachgewiesen werden und so der serologische Nachweis von SIVsmmPBj-Genprodukten durch IPA mit einer unabhängigen Methode bestätigt werden kann.

Zum Vergleich mit herkömmlichen Vektoren wurden C-Typ-retrovirale und lentivirale Vektoren, pseudotypisiert mit dem gleichen Hüllprotein (VSV-G), durch transiente Transfektion von 293T-Zellen hergestellt: [MLV(VSV-G)] und [HIV-1(VSV-G)]. Der verwendete herkömmliche, vom murinen Leukämievirus abgeleitete [MLV(VSV-G)]-Vektor überträgt das X-Gal-Gen, so daß die Genübertragung durch Expression dieses Markergens bestimmt werden konnte. [HIV-1(VSV-G)]-Vektoren wurden analog zu [SIVsmmPBj(VSV-G)] mit einem im *Env*-Gen deletierten HIV-1-Klon generiert, so daß die Genübertragung ebenfalls durch IPA und TAT-induzierte GFP-Expression gemessen wurde.

Verschieden arretierte Zellen wurden mit den 3 verschiedenen Vektortypen transduziert und die Genübertragungseffizienz (gemessen als Anteil der Zielzellen, die das übertragene Gen exprimieren) bestimmt. Die Ergebnisse waren wie folgt:

- 1) MLV-abgeleitete retrovirale Vektoren konnten nur sich teilende Zellen transduzieren.
- 2) HIV-abgeleitete lentivirale Vektoren konnten sich teilende und G1-arretierte Zellen transduzieren.
- 5
- 3) SIVsmmPBj-abgeleitete lentivirale Vektoren konnten sich teilende, in G1 und in G0 arretierte Zellen transduzieren.

Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 1 und der Abbildung 2 dargestellt.

10

	Vektor	Analysemethode	Transduktionstiter [i.U./ml]		
			Proliferierend	G1/S-Arrest	G0-Arrest
Experiment #1:	[SIV _{PBj} (VSV)]	IPA	8,00E+05	1,40E+05	6,40E+05
	"	GFP	2,10E+05	2,40E+05	1,00E+05
	[HIV-1(VSV)]	IPA	1,80E+05	9,90E+04	6,80E+03
	"	GFP	2,80E+05	1,30E+05	7,10E+03
	[MLV(VSV)]	X-Gal	9,90E+03	0	3,75E+01
Experiment #2:	[SIV _{PBj} (VSV)]	IPA	9,30E+05	5,50E+05	7,20E+05
	"	GFP	3,95E+05	3,40E+05	1,90E+05
	[HIV-1(VSV)]	IPA	3,10E+05	7,20E+04	2,00E+04
	"	GFP	3,00E+05	2,20E+05	4,90E+03
	[MLV(VSV)]	X-Gal	9,00E+03	5,00E+00	2,00E+02

Tab. 1: Vergleich der Effizienz verschiedener Vektoren zur Transduktion arretierter Zellen.

Patentansprüche

1. Retroviraler Vektor, der zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase fähig ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor von SIVsmmPBj14 abgeleitet ist.
2. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1, der ferner zur Transduktion von Zellen in der mitotischen und/oder in der G1-Phase fähig ist.
3. Retroviraler Vektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei ein Teil oder das gesamte env-Gen von SIVsmmPBj14 deletiert ist.
4. Retroviraler Vektor nach Anspruch 3, wobei die Deletion im SU-Bereich von env vorliegt.
5. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 – 4, wobei der Vektor als Pseudotypvektor vorliegt.
6. Retroviraler Vektor nach einem der Ansprüche 1 – 5, umfassend einen Teil oder das gesamte Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus.
7. Retroviraler Vektor nach Anspruch 6, wobei das Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt ist.
8. Retroviraler Vektor nach Anspruch 6, wobei das Hüllprotein das G-Protein von VSV ist.
9. Verfahren zur Herstellung von Pseudotypvektoren, umfassend die Schritte:
 - a) Deletieren eines Teils oder des gesamten env-Gens von SIVsmmPBj14 oder eines davon abgeleiteten Moleklarklons, und
 - b) Kotransfektion von Zellen mit dem in a) erhaltenen Konstrukt und einem Expressionskonstrukt für ein Hüllprotein eines zu SIVsmmPBj14 unterschiedlichen Virus.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei durch die Deletion des env-Gens das env-Oberflächenhüllprotein nicht mehr funktionsfähig ist.
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei die Zellen 293T-Zellen sind.
12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei das Virus aus HIV-1, SIVagm, SNV, MLV oder VSV ausgewählt ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 – 11, wobei das Hüllprotein das G-Protein von VSV ist.

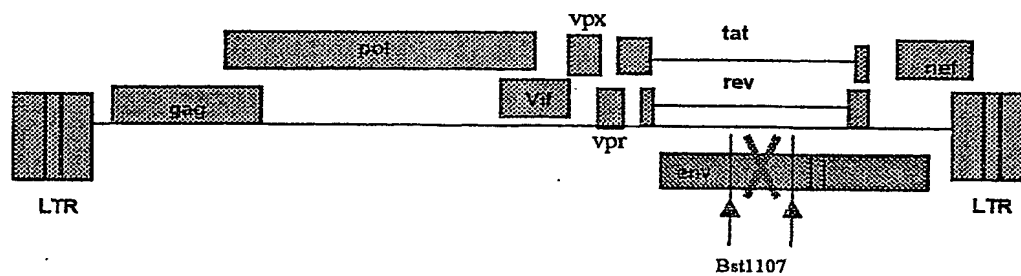
14. Pseudotypvektoren erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 9 – 13.

5 15. Verwendung eines Vektors nach einem der Ansprüche 1 – 8 und 14 zur Transduktion von Zellen in der G0-Phase.

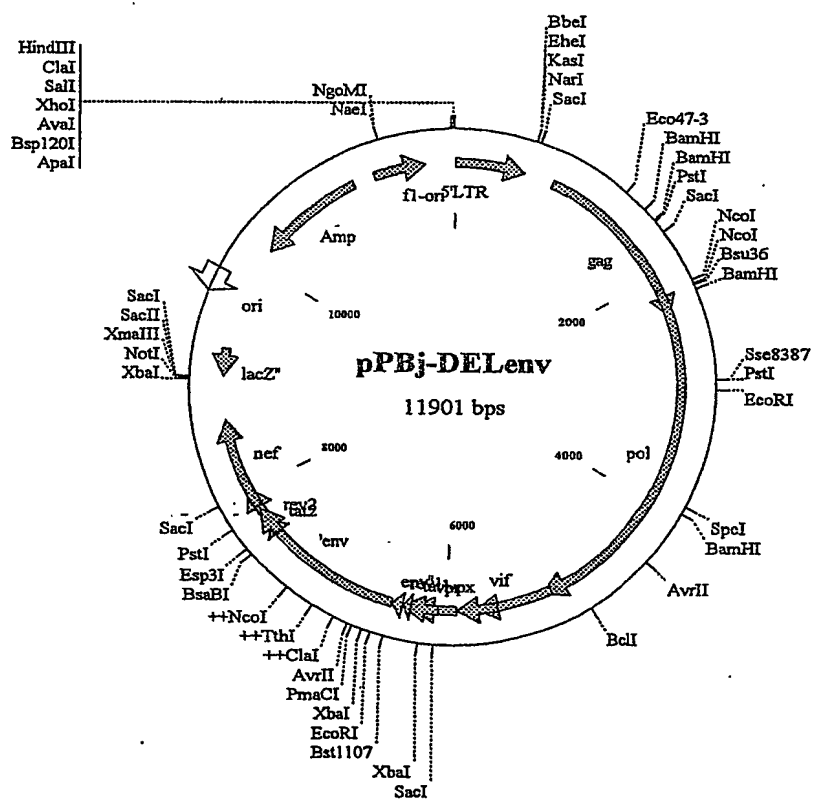
10 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei die Zellen Säugerzellen, insbesondere humane Lymphozyten sind.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei die Zellen in der G0-Phase aktiviert oder nicht aktiviert sind.

A)



B)



C)



Abb. 1

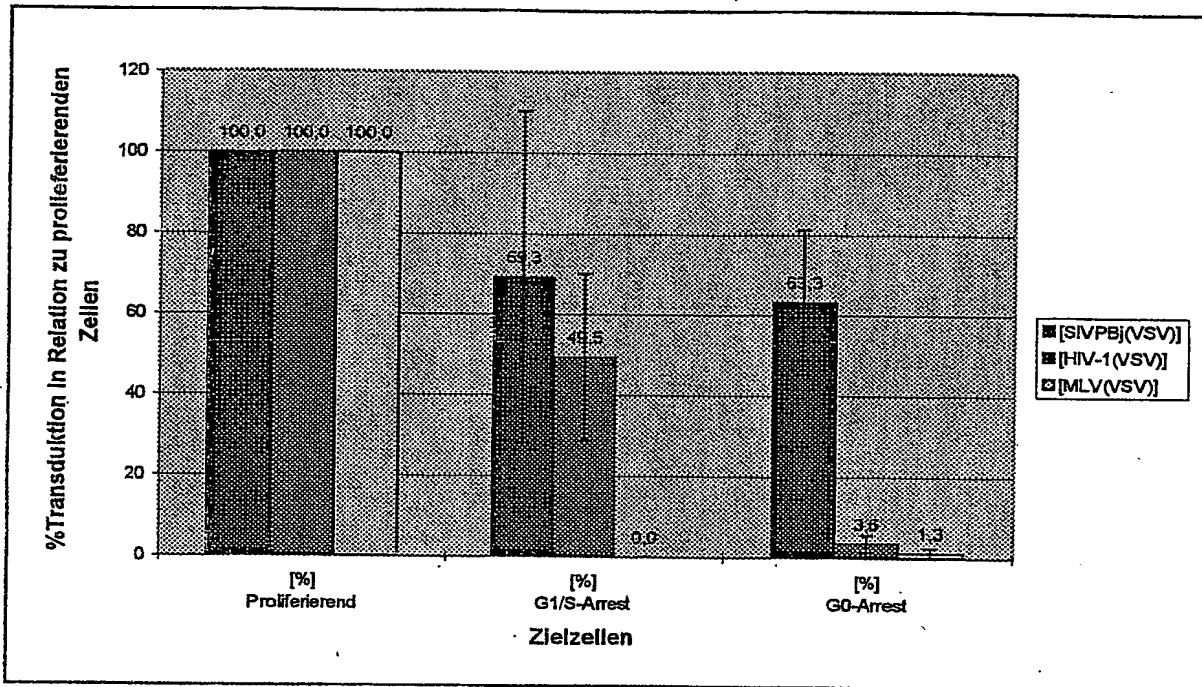


Abb. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/03500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/86 C07K14/155

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 212 084 A (MCCLURE HAROLD M ET AL) 18 May 1993 (1993-05-18) abstract Beispiele	1
A	WO 01 92506 A (PLANELLES VICENTE ; UNIV ROCHESTER (US)) 6 December 2001 (2001-12-06) abstract	1
A	WO 98 39463 A (UEBERLA KLAUS) 11 September 1998 (1998-09-11) abstract Beispiele	1
A	EP 1 035 210 A (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND LET) 13 September 2000 (2000-09-13) abstract	1
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 June 2003

Date of mailing of the international search report

11/07/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Panzica, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 03/03500

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>STEPHENS EDWARD B ET AL: "Simian-human immunodeficiency virus (SHIV) containing the nef/long terminal repeat region of the highly virulent SIVsmmPBj14 causes PBj-like activation of cultured resting peripheral blood mononuclear cells, but the chimera showed no increase in virulence."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 6, June 1998 (1998-06), pages 5207-5214, XP002245678 ISSN: 0022-538X abstract figure 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/03500

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5212084	A	18-05-1993	NONE	
WO 0192506	A	06-12-2001	AU 6519001 A WO 0192506 A1	11-12-2001 06-12-2001
WO 9839463	A	11-09-1998	AU 7332198 A WO 9839463 A2 EP 0991771 A2 JP 2001513643 T US 2002123471 A1	22-09-1998 11-09-1998 12-04-2000 04-09-2001 05-09-2002
EP 1035210	A	13-09-2000	DE 19909769 A1 EP 1035210 A2 US 6323031 B1 US 2001018202 A1	07-09-2000 13-09-2000 27-11-2001 30-08-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03500

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12N15/86 C07K14/155

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	US 5 212 084 A (MCCLURE HAROLD M ET AL) 18. Mai 1993 (1993-05-18) Zusammenfassung Beispiele	1
A	WO 01 92506 A (PLANELLES VICENTE ;UNIV ROCHESTER (US)) 6. Dezember 2001 (2001-12-06) Zusammenfassung	1
A	WO 98 39463 A (UEBERLA KLAUS) 11. September 1998 (1998-09-11) Zusammenfassung Beispiele	1
A	EP 1 035 210 A (BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND LET) 13. September 2000 (2000-09-13) Zusammenfassung	1
	-/-	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

26. Juni 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/07/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Panzica, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03500

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>STEPHENS EDWARD B ET AL: "Simian-human immunodeficiency virus (SHIV) containing the nef/long terminal repeat region of the highly virulent SIVsmmPBj14 causes PBJ-like activation of cultured resting peripheral blood mononuclear cells, but the chimera showed no increase in virulence."</p> <p>JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 6, Juni 1998 (1998-06), Seiten 5207-5214, XP002245678 ISSN: 0022-538X Zusammenfassung Abbildung 1</p> <p>-----</p>	1,9

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/03500

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5212084	A	18-05-1993	KEINE
WO 0192506	A	06-12-2001	AU 6519001 A 11-12-2001 WO 0192506 A1 06-12-2001
WO 9839463	A	11-09-1998	AU 7332198 A 22-09-1998 WO 9839463 A2 11-09-1998 EP 0991771 A2 12-04-2000 JP 2001513643 T 04-09-2001 US 2002123471 A1 05-09-2002
EP 1035210	A	13-09-2000	DE 19909769 A1 07-09-2000 EP 1035210 A2 13-09-2000 US 6323031 B1 27-11-2001 US 2001018202 A1 30-08-2001

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.